昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2007, 50(2): 101 – 105　　ISSN 0454-6296

家蚕30 kD特异性变应原的分析、纯化与质谱鉴定

刘志刚，张 杰，林 格

（深圳大学过敏反应与免疫学研究所，广东深圳 518060）

摘要：以Coca's提取液分别提取到不同时期家蚕 *Bombyx mori* 的粗浸液，利用SDS-PAGE和Western blotting鉴定其特异性变应原，然后用DEAE-52离子交换层析及切胶纯化出30 kD的特异性变应原，再经MALDI-TOF在线联机分析，所得质谱数据进入网站搜索分析。结果显示：1～5龄家蚕均有20条左右蛋白带，其中5龄家蚕有23条蛋白带，主带有11条（82、79、60、51、46、38、32、30、28、24和18 kD）。选用家蚕过敏患者阳性血清进行免疫印迹，1～4龄家蚕均显示出82和79 kD的特异性变应原；但只有5龄家蚕的30 kD蛋白为特异性变应原，通过离子交换层析和经切胶纯化出30 kD蛋白，再经MALDI-TOF-MS鉴定该蛋白为外膜蛋白。提示家蚕不同时期抗原成分有所变化，5龄家蚕新出现的30 kD蛋白为特异性变应原。

关键词：家蚕；过敏原；SDS-PAGE；Western blotting；离子交换层析；质谱分析

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)02-0101-05

Analysis, purification and identification of the 30 kD specific allergen of *Bombyx mori* using mass spectrometry

LIU Zhi-Gang, ZHANG Jie, LIN Ge (Allergy and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract: To analyse, identify and primarily purify *Bombyx mori* specific allergen using mass spectrometry, we made the crude extracts of different growing stages of the silkworm by Coca's extracts, identified its specific allergens by SDS-PAGE and Western blotting, purified the 30 kD specific allergenby DEAE-52 ion exchange chromatography and gel isolation, and analysed the data through website-searching after MALDI-TOF-MS online analysis. The results indicated that the silkworms at different growing stages had about 20 protein bands, and the 5th instar larvae had 23 protein bands. The molecular weights of the 11 major bands were 82, 79, 60, 51, 46, 38, 32, 30, 28, 24 and 18 kD, respectively. The results of Western blotting with the positive serum of anaphylactic patients showed that the 1st – 4th instar larvae all had the specific allergens whose molecular weights were 82 and 79 kD, respectively; only the 5th instar larvae all had the specific allergen of 30 kD. We purified the protein of 30 kD by ion exchange chromatography and gel isolation and identified it as ectoblast protein by MALDI-TOF-MS. The reults suggest that the antigen changes with different stages and the protein of 30 kD appeared newly at the 5th instar larva is stage-specific.

Key words: *Bombyx mori*; allergen; SDS-PAGE; Western blotting; ion-exchange chromatography; mass spectrometry

变态反应性疾病被世界卫生组织认为是当前世界性的重大卫生学问题，世界各国变态反应性疾病的总发病率为10%～30%（WHO Workshop，1996；Ruffilli and Bonini，1997），此类疾病包括过敏性哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮炎等，是临床上常见病和多发病。在引起变态反应性疾病众多的变应原中，蚕作为主要昆虫变应原，已被认为是引起Ⅰ型变态反应疾病的重要致敏原（Borelli *et al*.，1999），尤其是在我国南方地区。

蚕致敏途径主要是通过吸入性过敏及接触性过敏。蚕的排泄物、分泌物、脱落的鳞毛及其蜕皮碎片等经吸入和接触等方式引起过敏性哮喘已有较多报

基金项目：国家重点基础研究发展规划"973"项目（2005CB121000）；广东省科技重点计划项目（2003A3080502）；深圳市科技计划重点项目（200326）

作者简介：刘志刚，男，1959年10月生，江西南昌人，博士，教授，从事过敏原分子生物学研究，Tel.：86-0755-26558941；E-mail：LZG@szu.edu.cn

收稿日期 Received：2006-02-25；接受日期 Accepted：2006-09-10

道(Ebner and Kraft,1987;Takasu *et al*., 2002)。目前国内有关蚕变应原的分离、纯化及免疫学特性的研究未见报道。国外 Zaoming 等(1996)对蚕抗原成分进行了分析和鉴定,但对其特性抗原的纯化和质谱分析尚未见报道。我们分析鉴定及纯化出家蚕 *Bombyx mori* 的特异性抗原,并对其特异性抗原成分进行了质谱分析。

1 材料与方法

1.1 试虫

家蚕(蚁蚕以及 1、2、3、4 和 5 龄蚕)由广东省蚕种厂惠赠。

1.2 主要仪器和试剂

电泳装置(Bio-Rad 公司);AKTA FPLC (瑞士 Amersham 公司);HPLC-ESI-MS/MS (Agilent 1100 series LC/MSD Trap);乙腈(美国 Tedia 公司);甲酸(色谱纯,天津);ZORBAX300SB (Agilent);胰酶(Promega 公司);三氟乙酸(TFA,美国 Tedia 公司)。

1.3 样品制备

家蚕粗浸液制备参照本室常规提取方法(胡川等,2005)进行。

1.4 SDS-PAGE 和 Western blotting

按本室常规方法(胡川等,2005)进行。

1.5 凝胶内酶切

1.5.1 SDS-PAGE 分离:将家蚕粗浸液及其经两步层析后所得纯化蛋白样品分别进行 SDS-PAGE(12%分离胶,5%浓缩胶),考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色,用刀片分别将纯化前后的 30 kD 单一蛋白条带以 $1\ mm^3$ 体积切成胶粒,用含 50% 乙腈的 25 mmol/L NH_4CO_3 溶液使之脱色完全,微加热使胶粒完全干燥。

1.5.2 酶切前处理:干燥胶粒中加入含 1.5 mg/mL 二硫苏糖醇 (DTT)的 25 mmol/L NH_4HCO_3,56℃水浴 1 h;加入含 10 mg/mL 碘乙酰胺(IAA)的 25 mmol/L NH_4CO_3,暗室 37℃,1 h,100 mmol/L NH_4CO_3 洗涤数次,过夜干燥。

1.5.3 胰蛋白酶酶切:将干燥胶粒加 0.1 μg/μL 胰蛋白酶 5 ~ 10 μL 以及 200 μL 100 mmol/L NH_4CO_3,待充分湿润并覆盖干燥胶粒后,再补充 200 μL 100 mmol/L NH_4CO_3,37℃酶解 21 h。

1.5.4 混合肽提取:充分酶解后稍离心收集上清液;沉淀胶粒中再加 200 μL 0.2% 三氟乙酸,40℃保温 1 h,稍离心收集上清液;合并上清液,冷冻干燥,再用 150 μL 0.2%三氟乙酸溶解干燥粉末;混匀后进行 Model-TOF 鉴定。

1.6 MALDI-TOF-MS 条件

高压液相色谱仪(HPLC)通过电喷雾离子源(ESI)接口与质谱仪(MS)在线联接。HPLC 条件:色谱柱为 C_{18},ZORBAX300SB(5 μm, 2.1 mm × 150 mm);洗脱梯度为 5% ~ 60%,60 min;流动相:A 液为含 0.1%甲酸的水溶液(水为 HPLC 级),B 液为含 0.1%甲酸的乙腈溶液,流速 0.3 mL/min;柱温为室温;检测波长为 214 nm;自动进样器进样20 μL。ESI-MS/MS 检测条件:电喷雾电离源(ESI);正离子模式(positive mode);扫描范围:200 ~ 1 800 m/z,分离宽度为 4 m/z;自动串级质谱分析(Auto-MS/MS),干燥气温度 250℃,干燥气流速 10 L/min。

1.7 数据分析

将质谱所得全部肽段的质量数及其 MS/MS 图谱(碎片离子质量数)同时输入 NCBInr 数据库,使用 Mascot(http://www. matrixscience. com/, Matrix Science Ltd,UK)中的串级质谱数据搜索功能(MS/MS Ions Search)与库中相应肽段的理论质量数及其 MS/MS 裂解图谱进行相关性比较检索鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同龄期家蚕抗原成分的 SDS-PAGE

将蚁蚕及 1 ~ 5 龄蚕样品粗浸液经 12% SDS-PAGE,结果(图 1)显示:家蚕抗原蛋白分子量主要介于 10 ~ 125 kD,在家蚕不同时期均有清晰可见的 20 条左右的蛋白条带,其中蚁蚕和 1 龄蚕抗原成分基本相同,随着龄期增加、虫体增大,抗原蛋白条带逐渐增多,尤以 5 龄家蚕蛋白条带最多(23 条)。其中主带有 11 条:82、79、60、51、46、38、32、30、28、24 和 18 kD。

2.2 家蚕特异性变应原的 Western blotting 鉴定

选用对家蚕过敏患者的阳性血清,依次分别做 Western blotting,结果(图 2)显示:在家蚕的各个生理阶段中都出现的变应原有:82 kD 和 79 kD,并且在 5 龄蚕时期,出现了一个 30 kD 特异性新变应原。这表明随着家蚕的生长,在不同时期可出现新的蛋白,而其中就有 30 kD 特异性变应原蛋白。

2.3 5 龄蚕 30 kD 特异性抗原的纯化

将用 Coca's 提取 3 天的 5 龄蚕粗浸液,用 Tris 缓冲液透析,上柱,有6个蛋白峰(图3)。收集各

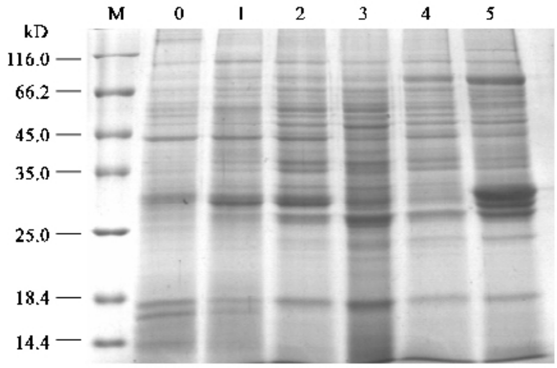


图 1　不同龄期家蚕粗浸液的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1　SDS-PAGE analysis of crude extracts from silkworm larvae at different stage

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；0：蚁蚕 Newly-hatched larva；1：1 龄幼虫 1st instar larva；2：2 龄幼虫 2nd instar larva；3：3 龄幼虫 3rd instar larva；4：4 龄幼虫 4th instar larva；5：5 龄幼虫 5th instar larva. 图 2 同 The same for Fig. 2.

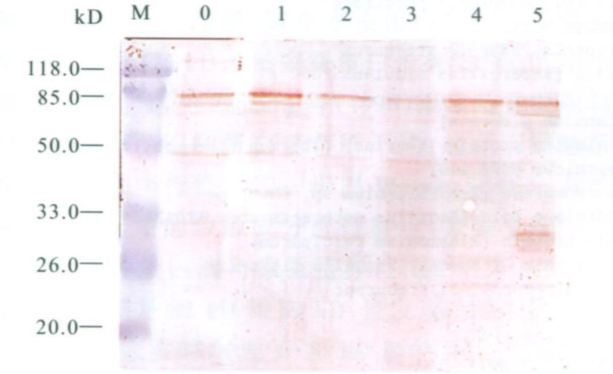


图 2　不同龄期家蚕抗原成分的 Western blotting 图谱

Fig. 2　Western blotting of allergic proteins from silkworm larvae at different stage

峰，进行 SDS-PAGE，再将收集到的各峰进行 Western blotting，结果显示，30 kD 特异性变应原出现在Ⅲ、Ⅳ两峰，其中Ⅳ峰浓度较高。

2.4　30 kD 纯化蛋白的质谱分析

将待鉴定的纯化蛋白条带凝胶用内胰蛋白酶酶切后，肽段混合物上 MALDI-TOF（图 4），所获得的相关质谱数据经 Mascot 检索得到得分最高匹配结果并排序，通过氨基酸鉴定还得出该蛋白的一些基本信息如等电点及氨基酸序列（图 5），图 5 中红色粗体标记的序列为实际检测到的肽段。生物信息学分析结果表示，30 kD 纯化蛋白质谱鉴定最具可能的蛋白是外膜蛋白（图 6）。

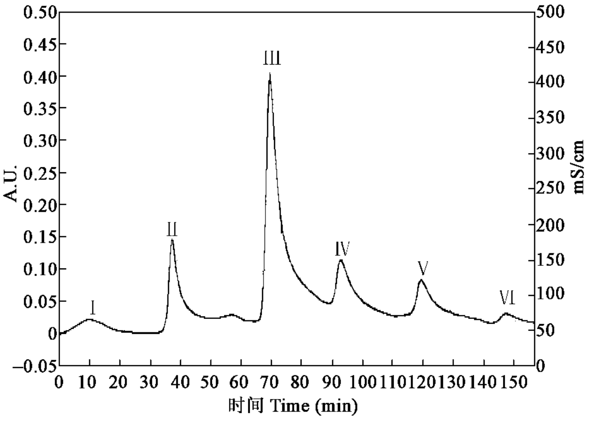


图 3　5 龄家蚕粗浸液 DE-52 离子交换层析结果

Fig. 3　DE-52 ion exchange chromatography of the crude extract from the 5th instar larvae of the silkworm

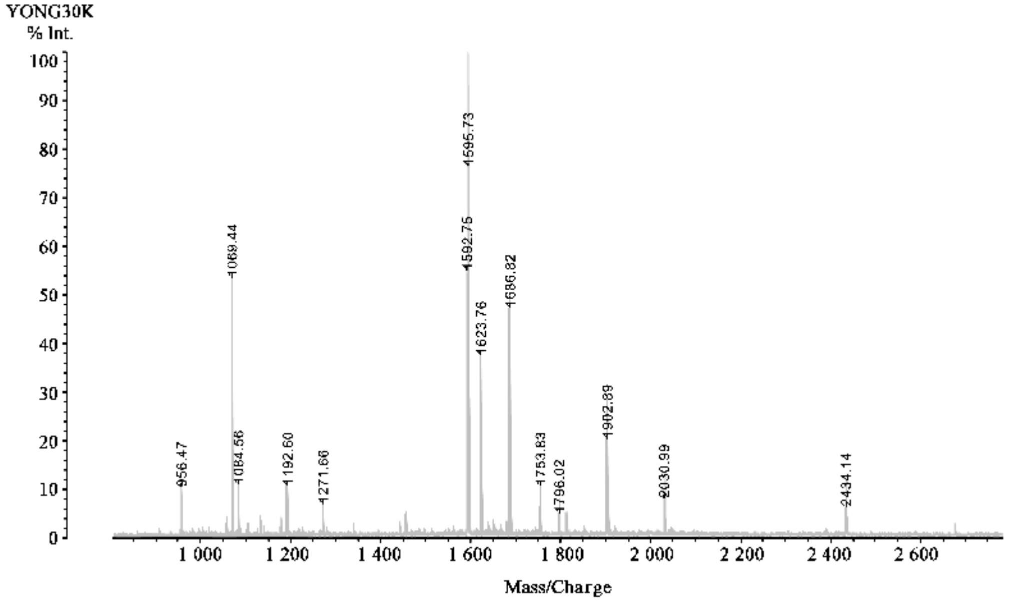
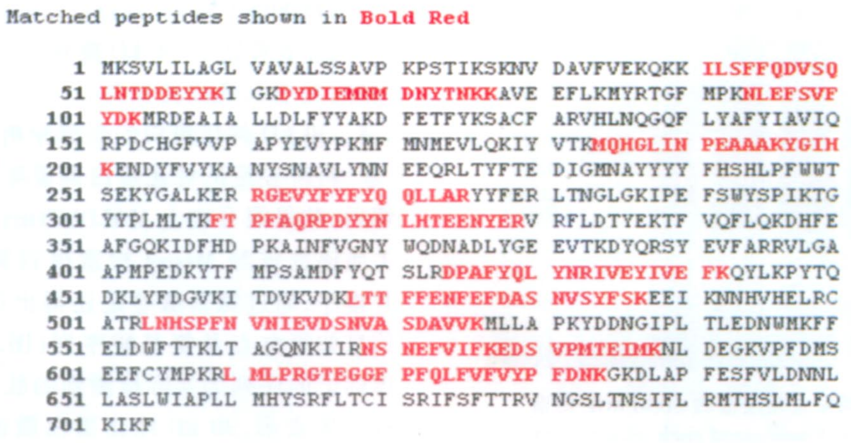


图 4　5 龄家蚕 30 kD 纯化蛋白 MALDI-TOF 质谱分析结果

Fig. 4　MALDI-TOF-MS of purified 30 kD protein from the 5th instar larvae of the silkworm

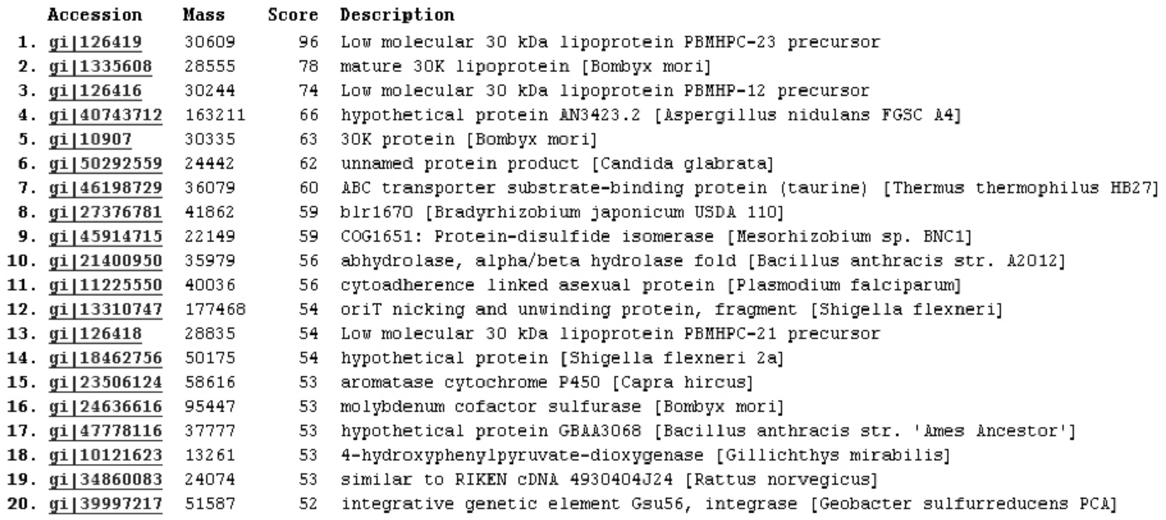


```
Matched peptides shown in Bold Red

  1 MKSVLILAGL VAVALSSAVP KPSTIKSKNV DAVFVEKQKK ILSFFQDVSQ
 51 LNTDDEYYKI GKDYDIEMNM DNYTNKKAVE EFLKMYRTGF MPKNLEFSVF
101 YDKMRDEAIA LLDLFYYAKD FETFYKSACF ARVHLNQGQF LYAFYIAVIQ
151 RPDCHGFVVP APYEVYPKMF MNMEVLQKIY VTKMQHGLIN PEAAAKYGIH
201 KENDYFVYKA NYSNAVLYNN EEQRLTYFTE DIGMNAYYYY FHSHLPFWWT
251 SEKYGALKER RGEVYFYFYQ QLLARYYFER LTNGLGKIPE FSWYSPIKTG
301 YYPLMLTKFT PFAQRPDYYN LHTEENYERV RFLDTYEKTF VQFLQKDHFE
351 AFGQKIDFHD PKAINFVGNY WQDNADLYGE EVTKDYQRSY EVFARRVLGA
401 APMPEDKYTF MPSAMDFYQT SLRDPAFYQL YNRIVEYIVE FKQYLKPYTQ
451 DKLYFDGVKI TDVKVDKLTT FFENFEFDAS NVSYFSKEEI KNNHVHELRC
501 ATRLNHSPFN VNIEVDSNVA SDAVVKMLLA PKYDDNGIPL TLEDNWMKFF
551 ELDWFTTKLT AGQNKIIRNS NEFVIFKEDS VPMTEIMKNL DEGKVPFDMS
601 EEFCYMPKRL MLPRGTEGGF PFQLFVFVYP FDNKGKDLAP FESFVLDNNL
651 LASLWIAPLL MHYSRFLTCI SRIFSFTTRV NGSLTNSIFL RMTHSLMLFQ
701 KIKF
```

图 5　家蚕 30 kD 纯化蛋白 MALDI-TOF 鉴定结果

Fig. 5　Identification of the purified 30 kD protein from the silkworm by MALDI-TOF-MS



```
     Accession     Mass    Score  Description
 1.  gi|126419     30609    96    Low molecular 30 kDa lipoprotein PBMHPC-23 precursor
 2.  gi|1335608    28555    78    mature 30K lipoprotein [Bombyx mori]
 3.  gi|126416     30244    74    Low molecular 30 kDa lipoprotein PBMHP-12 precursor
 4.  gi|40743712   163211   66    hypothetical protein AN3423.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]
 5.  gi|10907      30335    63    30K protein [Bombyx mori]
 6.  gi|50292559   24442    62    unnamed protein product [Candida glabrata]
 7.  gi|46198729   36079    60    ABC transporter substrate-binding protein (taurine) [Thermus thermophilus HB27]
 8.  gi|27376781   41862    59    blr1670 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]
 9.  gi|45914715   22149    59    COG1651: Protein-disulfide isomerase [Mesorhizobium sp. BNC1]
10.  gi|21400950   35979    56    abhydrolase, alpha/beta hydrolase fold [Bacillus anthracis str. A2012]
11.  gi|11225550   40036    56    cytoadherence linked asexual protein [Plasmodium falciparum]
12.  gi|13310747   177468   54    oriT nicking and unwinding protein, fragment [Shigella flexneri]
13.  gi|126418     28835    54    Low molecular 30 kDa lipoprotein PBMHPC-21 precursor
14.  gi|18462756   50175    54    hypothetical protein [Shigella flexneri 2a]
15.  gi|23506124   58616    53    aromatase cytochrome P450 [Capra hircus]
16.  gi|24636616   95447    53    molybdenum cofactor sulfurase [Bombyx mori]
17.  gi|47778116   37777    53    hypothetical protein GBAA3068 [Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor']
18.  gi|10121623   13261    53    4-hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase [Gillichthys mirabilis]
19.  gi|34860083   24074    53    similar to RIKEN cDNA 4930404J24 [Rattus norvegicus]
20.  gi|39997217   51587    52    integrative genetic element Gsu56, integrase [Geobacter sulfurreducens PCA]
```

图 6　家蚕 30 kD 纯化蛋白生物信息学比较结果

Fig. 6　Bioinformatic analysis of the purified 30 kD protein from the silkworm

3　讨论

家蚕是引起过敏反应性疾病的一种重要过敏原（变应原），主要丝蚕有桑蚕（家蚕）和山蚕（柞蚕）两大类，前者喂以桑树叶，后者主要以橡树为食物。两种蚕及其所产生的蚕丝都能引起过敏反应（Zaoming *et al*.，1996）。蚕丝是一种很强的生物致敏原。对蚕丝的职业性过敏者在缫丝厂、蚕种厂甚多见（Harindranath *et al*.，1985）。蚕丝可用作丝棉衣物、被褥的填充物，它是致敏的主要来源（Johansson *et al*.，1985）。蚕丝是动物蛋白，主要由丝素（fibroin）和丝胶（sericin）组成，前者约占 70%，但后者是蚕丝的主要变应原成分（Ebner and Kraft，1987）。除蚕丝外，蚕在整个生活周期产生的物质，如蚕尿、蚕蛹、蚕蛾鳞屑等也可诱发过敏反应（Kobayashi *et al*.，1975；文昭明等，1989；王旭东等，1994）。在雌雄蚕蛾交配时，有大量的鳞毛脱落，鳞毛及其碎片被人体吸入时，会诱发过敏患者出现哮喘。

蚕丝纤维由两根呈三角形或半椭圆形的丝素外包丝胶组成，横截面呈椭圆形。丝胶和丝素由 18 种氨基酸组成，约含 97% 的纯蛋白质。Dewair 等（1985）用 SDS-PAGE 将蚕丝蛋白分离为 12 种分子量在 14 到 70 kD 之间的多肽（Dewair *et al*.，1996）。Zaoming 等（1996）用 SDS-PAGE 将蚕丝提取物分离到 13 种分子量在 21～95 kD 的条带，并发现蚕丝过敏患者血清集中与分子量在 35～50 kD 之间的某一蛋白带结合。但有关蚕主要变应原的质谱分析尚未见报道。

目前，国内临床上进行体内过敏原检测和特异

性免疫治疗所使用的变应原浸液多为只经脱脂和有机溶剂(苯甲醇或苯酚)提取的粗提液。该种蚕提取液中含有多种蛋白质成分，其中包括变应原及其他非特异性蛋白成分。用该种蚕粗浸液进行体内试验和免疫治疗时，可能会造成高敏体质的病人出现严重的过敏反应，而众多的非特异成分则影响试验的特异性和敏感性。同时，由于缺乏严格的检测标准依据，再加上多种因素影响提取过程，使不同批次的蚕粗浸液所含的变应原成分和浓度有差异。运用这种未被定性和定量的变应原浸液进行临床研究，可造成研究结果间缺乏统一的比较标准，并影响临床疗效。因此迫切需要研制出具有本地区特色的标准化蚕变应原，以提高蚕过敏症诊断的特异性和临床疗效。

本研究结果显示：家蚕粗浸液经SDS-PAGE分离出清晰的蛋白条带，其中家蚕蛋白区带分子量主要介于10～125 kD，5龄家蚕蛋白带有23条，其中主带有11条。这与Zaoming等(1996)报道的蚕提取物分子量分布范围和蛋白带有所不同，提示不同地区生物物种的多样性。进一步用Western blotting方法对蛋白组分中的致敏成分进行鉴定，家蚕变应原中主要有2种蛋白能与家蚕特异性IgE结合，它们的分子量分别是82 kD和79 kD，且发现随着家蚕的长大，到5龄家蚕时出现了30 kD新特异性变应原蛋白，提示不同龄期变应原蛋白有所不同。研究结果还显示SDS-PAGE分离蛋白含量高的条带与家蚕变应原特异性IgE结合率并不一定高，提示家蚕抗原成分中蛋白含量的多少与特异性变应原致敏程度并不一致。

本研究通过离子交换层析初步纯化出30 kD蛋白成分，为5龄期家蚕特异性变应原。MALDI-TOF-MS分析提示该特异性变应原为外膜蛋白，提示5龄家蚕在虫体生长发育过程中，虫体体壁出现了新的蛋白组分，并具有致敏性。本研究为进一步开拓过敏性疾病变应原制剂的标准化以及探讨过敏性疾病更安全、更有效的诊断和治疗方法提供了理论基础。

参考文献(References)

Borelli S，Stern A，Wuthrich B，1999. A silk cardigan inducing asthma. *Allergy*，54(8)：900－901.

Dewair M，Baur X，Ziegler K，1985. Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*，76(4)：537－542.

Ebner H，Kraft D，1987. Wild silk-induced asthma：A contribution to the knowledge of inhalation allergies caused by wild and tussah silk-filled bed quilts. *Wein. Klin. Wochenschr.*，99(15)：542－546.

Harindranath N，Prakash O，Subba Rao PV，1985. Prevalence of occupational asthma in silk filatures. *Ann. Allergy*，55(3)：511－515.

Hu C，Liu ZG，Li JS，Han QG，Lin LF，Yin WX，2005. Identification of the major allergen in *Periplaneta americana* by HPLC-ESI-MS/MS. *Acta Entomol. Sin.*，48 (2)：305－309. [胡川，刘志刚，李金生，韩庆国，林立丰，阴伟雄，2005. 美洲大蠊主要变应原蛋白的质谱鉴定与分析. 昆虫学报，48 (2)：305－309]

Johansson SG，Wuthrich B，Zortea-Caflisch C，1985. Nightly asthma caused by allergens in silk filled bed quilts：clinical and immunological studies. *J. Allergy Clin. Immunol.*，75 (4)：452－459.

Kobayashi S，1975. Different aspects of occupational asthma in Japan. In：Frazier CA ed. Occupational Asthma. New York：Van Nostrand Reinhold Company. 132.

Ruffilli A，Bonini S，1997. Susceptibility genes for allergy and asthma. *Allergy*，52：256－273.

Takasu Y，Yamada H，Tsubouchi K，2002. Isolation of three main sericin components from the cocoon sericin of the silkworm，*Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*，66(12)：2 715－2 718.

Wang XD，Zheng SS，Zhang HY，Yan YL，1994. A study of occupational asthma and specific IgE in sericulture workers. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*，16(5)：323－327. [王旭东，郑珊珊，张宏誉，闫玉兰，1994. 养蚕工人职业性哮喘与特异性IgE水平. 中国医学科学院学报，16(5)：323－327]

Wen ZM，Zhou LX，Sun CC，Duan SQ，1989. Diagnosis of child allergic rhinitis caused by silk. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*，4(3)：9－10. [文昭明，周立新，孙长春，段淑琴，1989. 蚕丝致小儿变应性鼻炎的诊断. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，4(3)：9－10]

WHO Workshop，1996. Asthma Management and Prevention：the Global Initiative for Asthma Ascretariate. 1－2.

Zaoming W，Codina R，Fernandez-Caldas E，Lockey RF，1996. Partial characterization of the silk allergens in mulberry silk extract. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*，6(4)：237－241.

(责任编辑：黄玲巧)